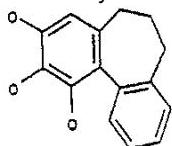


Даний винахід стосується засобів, що пошкоджують судини, які використовуються зокрема при отриманні засобів для лікування процесу утворення в тканинах нових судин, з групи похідних колхінолу, деякі з яких є новими сполуками.

Утворення нової мережі кровоносних судин шляхом розвитку кровоносних судин (ангіогенезу) є ключем до розуміння особливості патології деяких захворювань [J.Folkman, New England Journal of Medicine 333, 1757, (1995)]. Наприклад, тверда пухлина для того, щоб рости, повинна створити своє кровопостачання, від якого вирішальним чином залежить її забезпечення киснем і живильними речовинами; якщо ця система кровопостачання механічно відключається, пухлина піддається некротичній загибелі. Утворення нових судин є також клінічною особливістю пошкоджень шкіри при псоріазі, інвазивного панусу в суглобах хворих на ревматоїдний артрит і атеросклеротичних бляшок. Ретинальне утворення нових судин є патологічним при регенерації жовтої плями і при діабетичній ретинопатії. В усіх цих захворюваннях зміна напрямку (реверсія) утворення нових судин шляхом пошкодження новоутвореного судинного ендотелію, як очікується, має переважну терапевтичну дію.

Похідні колхінолу, наприклад, N-ацетил-колхінол, добре і відомі. Протипухлинна дія відзначалася на моделях тваринах; [див., наприклад; JNCI (journal National Cancer Institute), pages 379-392, 1952, Vol.13]. Однак, досліджена дія наносила значне пошкодження (haemorrhage, розм'якшення і некроз), у зв'язку з чим і не було запропоновано лікувати неадекватний процес утворення судин шляхом деструкції утворення нових судин.

Пошук по Chemical Abstracts (з 1955 року) на основі структури

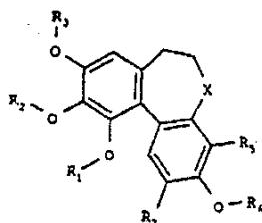


виявив ряд структур, які належать до похідних колхінолу.

Деякою мірою кожна з цих сполук вивчалась на протиракову активність, оскільки тубулін-зв'язувальні засоби могли б, як очікувалося, бути антимітотичними засобами і, отже, справляти пряму дію на пухлинні клітини.

В процесі роботи над даним винаходом вивчалася проблема релевантності тубулін-зв'язувальних властивостей для можливої ефективності в якості судиноруйнуючого засобу, але можливість передбачення не була виявлена. Наприклад, доцетаксел (docetaxel) (Lancet, 344, 1267-1271, 1994), який є тубулін-зв'язувальним засобом, не мав судиноруйнуючої дії навіть при введенні в Максимальній Допустимій Дозі. Навіть коли автори даного винаходу випробовували деякі сполуки, структурно подібні до сполук цього винаходу, терапевтичне вікно (відношення MT.D (максимальної допустимої дози) до MED (мінімальної ефективної дози)), як було встановлено, є надто невеликим для потенційної клінічної ефективності.

Згідно з цим винаходом, забезпечується застосування похідних колхінолу для одержання композицій для лікування захворювань, які зачіпають процес утворення нових судин, в яких похідна колхінолу має формулу:



де

R₁, R₂, R₃ та R₆ незалежно являють собою H, необов'язково заміщений алкіл, циклоалкіл, алкеніл, алкініл, аралкіл, алканойл, PO₃H₂;

X являє собою карбоніл (CO), тіокарбоніл (CS), метилен (CH₂) або групу CHR₄;

R₄ являє собою OH, O-алкіл або NR₈R₉;

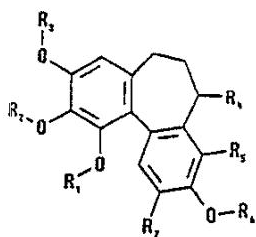
R₅ і R₇ незалежно являють собою H, алкіл, галоген, гідрокси-, алкокси-, нітро- або аміногрупу;

R₈ являє собою H, необов'язково заміщений алкіл, циклоалкіл, алканойл, тіоалканойл, арил, гетероарил, арилкарбоніл, гетероарилкарбоніл, алкоксикарбоніл, арилоксикарбоніл, амінокарбоніл, алкіламінокарбоніл, діалкіламінокарбоніл, ариламінокарбоніл, алкілсульфоніл, арилсульфоніл, аміносальфоніл, алкіламіносальфоніл, діалкіламіносальфоніл або ариламіносальфоніл;

i R₉ являє собою - H, алкіл або циклоалкіл;

та їх фармацевтично прийнятних солей, сольватів і гідратів.

Вважають, хоча це не є обмеженням винаходу, що застосування сполук даного винаходу пошкоджує новоутворену судинну мережу, наприклад, судинну мережу пухлин, ефективно змінюючи таким чином напрям процесу утворення судинної мережі, тоді як відомі антиангіогенічні засоби мають тенденцію до зниження ефективності при завершенні утворення судинної мережі. Деякі з цих сполук є новими. В одному втіленні нові сполуки є сполуками формули I, в яких принаймні один з R₁, R₂, R₃, R₆ являє собою PO₃H₂. В особливо прийнятному втіленні R₆ являє собою PO₃H₂. Особливо прийнятними є сполуки формули:



II

де

R_1 , R_2 і R_3 незалежно являють собою H, необов'язково заміщений алкіл, циклоалкіл, алкеніл, алкініл, алканол або PO_3H_2 ;

R_6 являє собою PO_3H_2 ;

R_4 являє собою H або NR_8R_9 ;

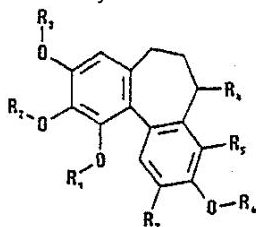
R_5 і R_7 незалежно являють собою H, алкіл, галоген, алкокси-, нітро- або аміногрупу;

R_8 являє собою H, необов'язково заміщений алкіл, циклоалкіл, алканол, тіоалканол, арил, гетероарил, арилкарбоніл, гетероарилкарбоніл, алкоксикарбоніл, арилоксикарбоніл, амінокарбоніл, алкіламінокарбоніл, діалкіламінокарбоніл, ариламінокарбоніл, алкілсульфоніл, арилсульфоніл, аміносурьфоніл, алкіламіносурьфоніл, діалкіламіносурьфоніл або ариламіносурьфоніл;

R_9 являє собою H, алкіл або циклоалкіл,

і їх фармацевтично прийнятні солі, сольвати і гідрати,

В іншому аспекті винаходу нові сполуки являють собою сполуки формули:



IIA

де

R_1 , R_2 і R_3 незалежно являють собою H, необов'язково заміщений алкіл, циклоалкіл, алкеніл, алкініл, алканол або PO_3H_2 ;

R_6 являє собою H, необов'язково заміщений алкіл, циклоалкіл, алкеніл, алкініл або PO_3H_2 ;

R_4 являє собою H або NR_8R_9 ;

R_5 і R_7 незалежно являють собою H, алкіл, галоген, нітро- або аміногрупу;

R_8 являє собою H, необов'язково заміщений алкіл, циклоалкіл, алканол, тіоалканол, арил, гетероарил, арилкарбоніл, гетероарилкарбоніл, алкоксикарбоніл, арилоксикарбоніл, амінокарбоніл, алкіламінокарбоніл, діалкіламінокарбоніл, ариламінокарбоніл, алкілсульфоніл, арилсульфоніл, аміносурьфоніл, алкіламіносурьфоніл, діалкіламіносурьфоніл або ариламіносурьфоніл;

і R_9 являє собою H, алкіл або циклоалкіл, за умови, що коли R_1 , R_2 і R_3 є метильними групами та R_4 являє собою водень, ацетиламіно-, ацетилметиламіно-, аміно-, метиламіно- або диметиламіногрупу, тоді R_6 не є воднем, метилом, гідроксметилом або ацетоксметилом,

та їх фармацевтично прийнятні солі, сольвати і гідрати.

Більш прийнятними сполуками, що використовуються у винаході, є сполуки, в яких R_1 , R_2 і R_3 являють собою алкіл, і сполуки, в яких R_4 являє собою ацил-аміногрупу.

Термін "алкіл", що застосовується в даному винаході (який включає будь-який ланцюг аліфатичної структури, що належить до алкілу), стосується групи з прямим або розгалуженим ланцюгом, що містить від одного до семи, більш прийнятно максимально чотири атоми вуглецю, такої як метил, етил, пропіл, ізопропіл, бутіл, втор-бутіл, трет-бутіл і пентил. Необов'язкові замісники, що можуть бути наявні в алкільних групах, включають один або більшу кількість замісників, вибраних з галогену, аміно-, моноалкіламіно, діалкіламіно, гідрокси, алкокси, алкілтіогрупи, алкілсульфонілу, ациламіно, алкоксикарбоніламіно, алканолу, ацилоксигрупи, карбоксилу, сульфатної або фосфатної груп. Прикладами алкілгруп є метокси-, етокси-, пропокси-, ізопропокси-, буюкси і трет-буюксигрупи. Термін "галоген" означає фтор, хлор, бром або йод.

Алкенільна група являє собою олефінову групу, що містить від двох до семи атомів вуглецю, наприклад метилен, етилен, н-пропілен, ізо-пропілен, н-бутилен, ізобутилен, втор-бутилен і трет-бутилен. Алкільна група являє собою групу, що складається з 2-7 атомів вуглецю, наприклад, етинілну, пропінілну або бутінілну групу.

Термін "арил", сам по собі або в поєднанні, стосується незаміщеної фенільної групи або фенільної групи, що містить один або більше, більш прийнятно від одного до трьох, замісників, прикладами яких є галоген, алкіл, галогеналкіл, гідрокси, нітро-, ціано-, аміно- і алкоксигрупа. Галогеналкільна група може містити один або більше атомів галогену, прикладами таких груп є трифторметил і дихлорметил.

Термін "гетероарил", в даному описі стосується моно- або біциклічної ароматичної групи, що містить від одного до чотирьох гетероатомів, вибраних в будь-якому поєднанні з атомів N, S або O, найбільше - з 9 атомів вуглецю. Приклади гетероарильних груп включають піридил, піримідил, фурил, тієніл, піроліл, піразоліл, індоліл, бензофурил, бензотієніл, бензотіазоліл, оксазоліл, ізоксазоліл, тіазоліл, ізотіазоліл, імідазоліл, триазоліл, хіноліл та ізохіноліл.

Термін "аралкіл" у даному описі стосується алкільної групи як визначено раніше, в якій один з атомів водню заміщений арильною або гетероарильною групою, як визначено в описі.

У тому випадку, коли одна або більше функціональних груп сполук формул I, II, IIA є основними або

кислотними, можливим є утворення солей. Підходжі солі включають фармацевтично прийнятні солі, наприклад, кислотно-адитивні солі, у тому числі гідрохлориди, гідроброміди, фосфати, сульфати, гідросульфати, алкілсульфонати, арилсульфонати, ацетати, бензоати, цитрати, малеати, фумарати, сукцинати, лактати і тартрати, солі, одержані з неорганічних основ, у тому числі солі лужних металів, такі як солі натрію або калію, солі лужноземельних металів, такі як солі кальцію або магнію, та солі, одержані з органічних амінів, такі як солі морфоліну, піперидину або диметиламіну.

Кваліфікованому фахівцю зрозуміло, що сполуки формул I, II, IIA можуть існувати у вигляді стереоізомерів і/або геометричних ізомерів, і відповідно, даний винахід включає всі такі ізомери та їх суміші.

Група корисних сполук включає сполуки, в яких кожен з R_1 , R_2 і R_3 являє собою алкіл.

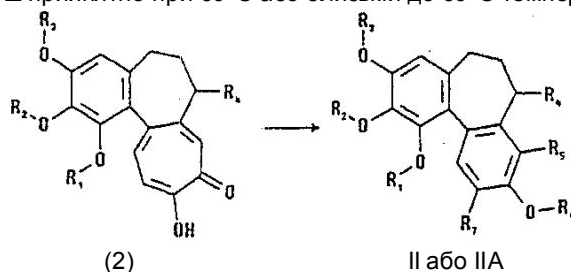
Інша група корисних сполук включає сполуки, в яких кожен з R_1 , R_2 і R_3 являє собою алкіл, і кожен з R_5 і R_7 являє собою водень. Більш прийнятну підгрупу корисних сполук складають сполуки, в яких кожен з R_1 , R_2 і R_3 являє собою метил і R_6 являє собою водень, алкіл або PO_3H_2 .

Більш прийнятні корисні сполуки згідно з винаходом включають:

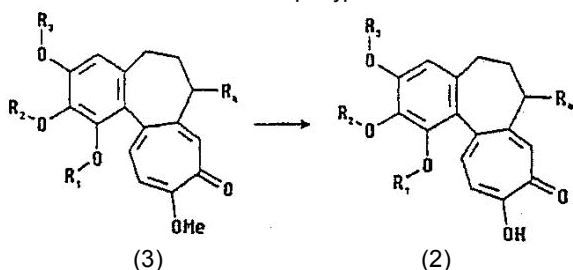
N-Ацетилколінол-O-фосфат і його солі, сольвати та гідрати.

Сполуки формул I, II або IIA можуть бути одержані за допомогою ряду способів, як описано нижче в загальному вигляді і більш докладно далі в Прикладах. В поданому далі описі способів R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 і R_7 в наведених формулах являють собою групи, описані вище для формул I, II або IIA, якщо не вказане інше значення. В описаних нижче схемах може бути потрібним застосування захисних груп, які потім на кінцевих стадіях синтезу вилучаються. Відповідне застосування таких захисних груп і способи їх вилучення будуть очевидні для кваліфікованого фахівця.

Таким чином, згідно з ще одним аспектом винаходу, сполуки формул II або IIA, в яких кожен з R_5 , R_6 і R_7 являє собою водень, можуть бути одержані обробкою сполуки формули (2) лужним пероксидом водню. Реакція може зручно проводитися у водному розчині гідроксиду натрію за відсутності або в присутності спільного розчинника, такого як спирт, наприклад етанол, при температурі в інтервалі, наприклад, 0-100°C, більш прийнятно при 60°C або близькій до 60°C температурі.



Проміжні продукти формули (2) можуть бути одержані кислотним гідролізом сполук формул (3). Реакцію стандартно проводять у водній кислоті, такої як соляна кислота, при підвищеній температурі, наприклад, при 100°C або близькій температурі 100°C.



Сполуки формули (3) є відомими сполуками або можуть бути одержані з колхіцину у стандартні способи.

Сполуки формул I, II або IIA також можуть бути одержані з інших сполук формул I, II або IIA шляхом хімічних перетворень. Прикладами хімічних перетворень, які можуть застосовуватися для цього, є стандартне алкілювання, арилування, гетероарилування, ацилювання, тіоацилювання, сульфонування, сульфатування, фосфорилювання, ароматичне галогенування і реакції сполучення (зв'язування). Ці реакції можуть застосовуватися для введення нових або для модифікації вже наявних замісників. Альтернативно, замісники, наявні в сполуках формул I, II або IIA, можуть бути модифіковані, наприклад, окисленням, відновленням, елімінуванням, гідролізом або іншими реакціями розщеплення для одержання інших сполук формул I, II або IIA.

Отже, сполука формул II або IIA, що містить, наприклад, аміногрупу, може ацилюватися по аміногрупі обробкою, наприклад, ацилгалогенідом або галогенангідридом в присутності основи, наприклад, третинної аміної основи, такої як триетиламін, наприклад, в розчиннику, такому як вуглеводневий розчинник, наприклад, дихлорметан, при температурі в інтервалі, наприклад, від -30°C до 120°C, зазвичай при кімнатній температурі або близькій до кімнатної.

В іншому загальному прикладі взаємного перетворення аміногрупа в сполуці формул II або IIA може сульфонуватися обробкою, наприклад, алкіл- або арилсульфонілхлоридом або алкіл- або арилсульфоновим ангідридом в присутності основи, наприклад, третинної аміної основи, такої як триетиламін, наприклад, у розчиннику, такому як вуглеводневий розчинник, наприклад, дихлорметан, при температурі в інтервалі, наприклад, від -30°C до 120°C, зазвичай при кімнатній температурі або близькій до кімнатної.

В ще одному загальному прикладі сполука формули II або IIA, що містить гідрокси групу, може перетворюватися на відповідний складний дигідрофосфатний ефір обробкою, наприклад, ди-трет-бутилдіетилфосфорамідом (diethylphosphoramidite) в присутності підходящого каталізатора, наприклад,

тетразолу. У розчиннику, такому як ефірний розчинник, наприклад, тетрагідрофуран, при температурі в інтервалі від -40 до 40°C, зазвичай при кімнатній температурі або температурі, близькій до кімнатної, з подальшою обробкою окислювачем, наприклад, 3-хлорпероксибензойною кислотою, при температурі в інтервалі від -78°C до 40°C, більш прийнятно від -40°C до -10°C. Проміжний фосфатний триєфір, що утворюється, обробляють кислотою, наприклад, трифтороцтовою кислотою, в розчиннику, такому як хлорований розчинник, наприклад, дихлорметан, при температурі в інтервалі від -30°C до 40°C, як правило при температурі 0°C або близькій до неї, для одержання сполуки формули (2), що містить складний дигідрофосфатний ефір.

В ще одному загальному прикладі сполука формули (2), яка містить амідогрупу, може бути гідролізована обробкою, наприклад, кислотою, такою як соляна кислота, в розчиннику, такому як спирт, наприклад, метанол, при підвищеній температурі, зазвичай при кипінні із зворотним холодильником.

В іншому загальному прикладі О-алкільна група може розщеплюватись з утворенням відповідного спирту (ОН) при взаємодії з трибромідом бору в розчиннику, такому як хлорований розчинник, наприклад, дихлорметан, при низькій температурі, наприклад, близько -78°C.

В ще одному загальному прикладі сполуки формул II або IIA можуть алкілюватись взаємодією з підходящим алкілювальним агентом, таким як алкілгалогенід, алкілтолуолсульфонат, алкілметансульфонат або алкілтрифлат (alkyl triflate). Реакція алкілювання може проводитись в присутності основи, наприклад, неорганічної основи, такої як карбонат, наприклад, карбонат кальцію або калію, гідриду, такого як гідрид натрію, або алкоксиду, такого як трет-бутоксид калію, в підходящому розчиннику, такому як апротонний розчинник, наприклад, диметилформамід, або ефірний розчинник, такий як тетрагідрофуран, при температурі приблизно від -10 до 80°C.

Одержання сполуки формул II або IIA у вигляді єдиного енантіомеру або, коли це підходить, діастереомеру, може проводитись шляхом синтезу з енантіометрично чистого вихідного матеріалу або проміжного продукту або шляхом поділу кінцевого продукту у стандартний спосіб.

Кислотно-адитивні солі сполук формул II або IIA одержують у стандартний спосіб обробкою розчину або суспензії вільної основи II або IIA приблизно одним еквівалентом фармацевтично прийнятної кислоти. Солі сполук формул I, II або IIA та неорганічних або органічних основ одержують у стандартний спосіб обробки розчину або суспензії вільної кислоти I, II або IIA приблизно одним еквівалентом фармацевтично прийнятної органічної або неорганічної основи. Альтернативно, і кислотно-адитивні солі, і солі основ можуть бути одержані обробкою вихідної сполуки підходящою іонообмінною смолою у стандартний спосіб. Стандартні способи концентрування та перекристалізації можуть застосовуватись для виділення солей.

Сполуки відповідно до цього винаходу здатні руйнувати судинну мережу пухлини і новоутворену судинну мережу, залишаючи без змін нормальну зрілу судинну мережу. Здатність сполук діяти таким чином може бути виявлена за допомогою випробувань, описаних далі в Прикладах.

Таким чином, сполуки відповідно до цього винаходу особливо корисні для профілактики і лікування ракових захворювань, включаючи тверді пухлини, для профілактики і лікування захворювань, при яких має місце неадекватний розвиток кровоносних судин, таких як діабетична ретинопатія, псоріаз, ревматоїдний артрит, атеросклероз і дегенерація жовтої плями.

Сполуки даного винаходу можуть вводитись в якості єдиних терапевтичних засобів або в поєднанні з іншими засобами лікування. Для лікування твердих пухлин сполуки даного винаходу можуть вводитись в поєднанні з радіотерапією, або в поєднанні з іншими протипухлинними речовинами, вибраними, наприклад, з мітотичних інгібіторів, наприклад, з вінбластином, паклітакселем і доцетакселем; з алкілювальними агентами, наприклад, з цисплатином, карбоплатином і циклофосфамідом, антиметаболітами, наприклад, з 5-фторурацилом, цитозинарабінозидом (cytosine arabinoside) і гідроксисечовиною; з інтеркалатувальними засобами, наприклад, з адриаміцином і блеомицином; з ферментами, наприклад, з аспарагіназою; з інгібіторами топоізомерази, наприклад, з етопозидом, топотеканом та іринотеканом; з інгібіторами тимідилатсинтази, наприклад, з ралтитрекседом; з модифікаторами біологічної відповіді, наприклад, з інтерфероном; з антитілами, наприклад, з едреколомабом, і з антигормонами, наприклад, з тамоксифеном. Таке комбіноване лікування може включати одночасне або послідовне застосування окремих компонентів лікування.

Для профілактики і лікування захворювань сполуки відповідно до винаходу можуть вводитись у вигляді фармацевтичних композицій, вибраних з урахуванням передбачуваного способу введення і стандартної фармацевтичної практики. Такі фармацевтичні композиції можуть мати форму, прийнятну для перорального, трансбукального, назального, місцевого, ректального або парентерального введення, і можуть бути одержані у стандартний спосіб з використанням стандартних наповнювачів. Наприклад, фармацевтичні композиції для перорального введення можуть мати форму таблеток або капсул. Для назального введення або введення інгаляцією сполуки можуть зручно доставлятися у вигляді порошку чи розчину. Місцеве введення може здійснюватися у вигляді мазі або крему, і ректальне введення може здійснюватися у вигляді свічки. Для парентеральної ін'єкції (включаючи внутрішньовенну, підшкірну, внутрішньом'язову, внутрішньосудинну ін'єкцію або вливання) композиція може мати форму, наприклад, стерильного розчину, суспензії або емульсії.

Доза сполуки винаходу, необхідна для профілактики або лікування конкретного стану, буде змінюватися залежно від вибраної сполуки, способу введення, форми і тяжкості стану і залежно від того, чи призначена сполука для введення сама по собі або в поєднанні з іншим лікарським засобом. Отже, точна доза буде визначатись лікуючим лікарем, але звичайні щоденні дози можуть лежати в інтервалі від 0,001 до 100 мг/кг, більш прийнятно від 0,1 до 50 мг/кг.

Біологічна активність

Описані далі випробування використовувались для демонстрації активності і селективності сполук відповідно до винаходу.

Активність відносно судинної мережі пухлини, виміряна за допомогою радіоактивного індикатора

Описаний далі експеримент показує здатність сполук селективно пошкоджувати судинну мережу пухлини.

Підшкірні CaNT пухлини ініціюють ін'єкцією миші у віці 16 тижнів 0,05мл неочищеної суспензії клітин пухлини, приблизно 10^6 клітин, підшкірно вище тильної поверхні задньої кінцівки (overlying the rear dorsum). Тварин відбирають для лікування через приблизно 3-4 тижні, коли їх пухлини досягають діаметру 5,5-6,5мм. Сполуки розчиняють в стерильному фізіологічному розчині вводять інтраперитонеально в об'ємі 0,1мл на 10г маси тіла. Кровопостачання пухлини вимірюють через 6 годин після інтраперитонеального введення в пухлини, нирці, печінці, шкірі, м'язах, кишечнику і мозку методом $^{86}\text{RbCl}$ екстракції (Sapirstein, Amer J.Physiol, 193, 161-168, 1958). Радіоактивність тканини, виміряну через 1 хвилину після внутрішньовенного введення $^{86}\text{RbCl}$, використовують для обчислення відносного кровотоку як частини одержаних даних для роботи серця (as a proportion of cardiac output) Pill and Denekamp, Brit J.Radiol., .55, 905-913, 1982). Для контролю і в групах, що обробляються, використовують п'ять тварин. Результати подають у вигляді відсотка від кровотоку у відповідних тканинах у тварин, оброблених фізіологічним розчином.

Активність відносно судинної, мережі, виміряна за допомогою флуоресцентного барвника

Описаний далі експеримент додатково показує здатність сполук пошкоджувати судинну мережу пухлини.

Об'єм судинної мережі пухлини CaNT мишей, що мають пухлину, вимірюють з використанням флуоресцентного барвника Hoechst 33342 згідно з методом Smith et al. [Brit. J Cancer 57, 247-253, 1988]. У контрольній та обробленій групах використовують по п'ять тварин. Флуоресцентний барвник розчиняють у фізіологічному розчині, одержуючи концентрацію 6,25мг/мл, і вводять внутрішньовенно з розрахунку на 10мг/кг через 6 годин після інтраперитонеального введення лікарського засобу. Через одну хвилину тварин умертвляють, пухлини вирізають та заморожують; на 3 різних рівнях вирізають ділянки розміром 10мм і досліджують їх під УФ освітленням з використанням Olympus мікроскопу, який має епіфлуоресценцію. Кровоносні судини ідентифікують за допомогою їх флуоресцентних схем, і об'єм судинної мережі обчислюють з використанням point scoring системи, описаної в публікації [Chalkley, J.Natl Cancer Inst., 5, 47-53, 1943]. Всі оцінки ґрунтуються на обчисленні мінімальної з 100 областей секцій, взятих з 3 різних рівнів. Сполуки винаходу зменшують функціональний об'єм судинної мережі пухлини на більш ніж 20% в лозах 50мг/кг або нижче.

Наведені далі не обмежувальні приклади ілюструють винахід. В прикладах всі $^1\text{H-NMR}$ спектри одержані при 300МГц, якщо не вказано іншого значення. Колонкову хроматографію проводять на силікагелі. Всі температури подаються у $^{\circ}\text{C}$. Використовуються такі аббревіатури: THF - тетрагідрофуран, DMSO - диметилсульфоксид; MCPBA - 3-хлорпероксибензойна кислота.

Приклад 1

N-ацеогилколхінол-О-фосфат

Розчин N-ацетилколхінолу (260мг, 0,76ммоль) у безводному THF (2мл) в атмосфері азоту обробляють ди-трет-бутилдіетилфосфорамідом (189мг, 0,75ммоль) і 1(H)-тетразолом (0,14г, 1,99ммоль), розчин перемішують при 20°C протягом 0,5 години. Розчин охолоджують до -40°C і додають розчин 85% MCPBA (202мг, 0,99ммоль) в безводному дихлорметані (2мл) з такою швидкістю, щоб температура залишалася нижчою від -10°C . Розчин залишають нагріватися до кімнатної температури, додають діетиловий ефір (30мл) і одержаний розчин промивають послідовно 10% водним метабісульфітом натрію ($2 \times 25\text{мл}$), 5% водним гідрокарбонатом натрію ($2 \times 25\text{мл}$), 5% водною лимонною кислотою (30мл), 5% водним гідрокарбонатом натрію та насиченим розчином солі. Органічний розчин концентрують при пониженому тиску і залишок очищають колонковою хроматографією, одержують білу піну (170мг), що містить N-ацетилколхінол-О-ди-трет-бутилфосфат, який повторно розчиняють в дихлорметані (5мл), охолоджують до 0°C і обробляють трифтороцтовою кислотою (0,5мл).

Розчин залишають нагріватися до кімнатної температури і перемішують 1 годину, потім концентрують при пониженому тиску і розтирають з ефіром, одержують цільову сполуку (110мг) у вигляді твердої білої речовини, т. пл. $233-235^{\circ}\text{C}$. δ Н (d_6 -DMSO), 8,38 (д, 1Н, J=8Гц), 7,27 (д, 1Н, J=7Гц), 7,12 (д, 1Н, J=8Гц), 7,10 (с, 1Н), 6,77 (с, 1Н), 4,48 (м, 1Н), 3,81 (с, 3Н), 3,76 (с, 3Н), 3,49 (с, 3Н), 2,5 (сигнал, частково затінений DMSO), 1,9-2,2 (м, 2Н), 1,86 (с, 3Н).

Активність фосфатної сполуки вимірюють методом радіоактивного індикатора, описаним раніше: сполука даного Прикладу дає 65% зниження кровотоку в пухлині в дозі 125мг/кг при незначному зниженні кровотоку в шкірі, м'язах, печінці, нирці, кишечнику або серці.

Фосфатну сполуку порівнюють з вихідним N-ацетил-колхінолом за максимальною толерантною дозою (MTD) (відсутність смерті у трьох тварин), мінімальною ефективною дозою (MED), виміряною методом флуоресцентного барвника, описаним вище, і терапевтичним вікном (MTD/MED).

	MTD Мг/кг маси тіла	MED Мг/кг маси тіла	Терапевтичне вікно (MTD/MED)
N-ацетилколхінол	125	30	4
M-ацетилколхінол-О-фосфат	750	50	15

Хоча фосфат має дещо більш високу MED, його "вікно" значно більше. Це було несподіваним. Фосфат також дає більшу розчинність.

Для порівняння "терапевтичні вікна" колхіцину (найбільш близька структура до даних сполук) і доцетакселю (тубулін-зв'язувальні ліки, що продаються як "Taxotere", які не мають судиноруйнуючу активність) подані в наведеній далі таблиці:

Таблиця 1

Терапевтичні вікна інших тубулін-зв'язувальних

засобів (метод флуоресцентного барвника)

Сполука	MED (мг/кг маси тіла)	MTD (мг/кг маси тіла)	MTD/MED
Досетаксел	>30 (відсутність дії при 30)	30	<1
Колхіцин	2,5	5	2

Приклад 2

N-Етилколхінол

Розчин N-ацетилколхінолу (500мг, 1,4ммоль) в THF (15мл) краплями протягом 15 хвилин додають до суспензії алюмо-гідриду літію (106мг, 2,74ммоль) в THF (10мл) з охолодженням на крижаній бані. Суміш кип'ятять із зворотним холодильником протягом 15 годин, дають їй охолотитися і обробляють додатковою кількістю алюмогідриду літію (53мг, 1,4ммоль), потім кип'ятять із зворотним холодильником протягом додаткових 3 годин. Суміш охолоджують (крижана баня) і краплями додають воду (10мл), потім екстрагують трьома порціями етилацетату. Об'єднані, висушені (MgSO_4) екстракти концентрують при пониженому тиску до зеленої смоли, яка при розтиранні з ефіром дає цільову сполуку у вигляді твердої речовини світло-зеленого кольору, т. пл. 185°C (розкл.), m/e 343 (M^+). Елементний аналіз: розраховано для $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C 66,46; H 7,53; N 3,88; знайдено: C 66,50; H 7,17; N 3,79.

Приклад 3

N-Бензилоксикарбонілколхінол

Розчин колхінолу (625мг, 1,98ммоль) в сухому піридині (10мл) обробляють бензилхлорформіатом (0,566мл, 3,97ммоль), додаючи його краплями, і суміш перемішують протягом 16 годин. Розчинник відганяють при пониженому тиску, додають воду і одержану суміш екстрагують трьома порціями хлороформу. Об'єднані, висушені (MgSO_4) екстракти упарюють при пониженому тиску до темно-коричневої смоли, яку піддають очищенню колонковою хроматографією на силікагелі (елювання: 50% етилацетат/петролейний ефір). Одержану оранжеву смолу кристалізують з суміші ефір/петролейний ефір, одержують цільову сполуку (346мг) у вигляді твердої речовини блідо-жовтого кольору, т. пл. $79-81^\circ\text{C}$, m/e 449 (M^+), Елементний аналіз для $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NO}_6 \cdot 0,33\text{H}_2\text{O}$: розраховано: C 68,57; H 6,07; N 3,08; знайдено C 68,71; H 6,18; N 2,91.

Приклад 4

N-(фенілкарбамоїл)колхінол

Розчин колхінолу (400мг, 1,27ммоль) в сухому піридині (10мл) обробляють фенілізоціанатом (0,151мл, 1,39ммоль), додаючи його краплями, суміш перемішують протягом 18 годин, потім кип'ятять із зворотним холодильником протягом 2 годин. Розчинник відганяють при пониженому тиску, додають воду і одержану суміш екстрагують трьома порціями хлороформу. Об'єднані, висушені екстракти концентрують при пониженому тиску до темно-коричневої смоли, яку очищають колонковою хроматографією на силікагелі (елювання: 35% етилацетат/петролейний ефір). Одержану смолу кристалізують з суміші ефір/петролейний ефір, одержують цільову сполуку (261мг) у вигляді твердої речовини світло-оранжевого кольору, т. пл. $145-146^\circ\text{C}$, m/e 434 (M^+).

Приклад 5

N-Мезилколхінол

Розчин N,O-димезилколхінолу (234мг, 0,5ммоль) в метанолі (8мл) обробляють гідроксидом натрію (40мг, 1ммоль), суміш кип'ятять із зворотним холодильником протягом 3 годин. Розчинник відганяють при пониженому тиску, додають воду (5мл). Середовище розчину роблять нейтральною за допомогою 1М соляної кислоти і екстрагують трьома порціями диетилметану. Об'єднані, висушені (MgSO_4) упарюють при пониженому тиску, одержують цільову сполуку (123мг) у вигляді твердої речовини рожевого кольору, т. пл. $234-236^\circ\text{C}$, m/e 393 (M^+).

N,O-Димезилколхінол, який використовується в якості вихідного матеріалу, одержують так: Розчин колхінолу (500мг, 1,6ммоль) в сухому піридині (15мл) обробляють мезилхлоридом (0,135мл, 1,7ммоль) і суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 36 годин. Додають додаткову кількість мезилхлориду (0,135мл, 1,7ммоль) та перемішування продовжують ще 16 годин. Розчинник відганяють при пониженому тиску, додають воду (5мл). Розчин екстрагують трьома порціями хлороформу та з'єднані висушені екстракти упарюють при пониженому тиску, одержують коричневу смолу, яка після очищення колонковою хроматографією на силікагелі (елювання: етилацетат) дає N,O-димезилколхінол (292мг) у вигляді твердої речовини світло-оранжевого кольору.

Приклад 6

N-Диметилсульфамоїлколхінол

Розчин колхінолу (50мг, 0,16ммоль) в сухому ацетонітрилі (3мл) і триетиламіні (0,022мл, 0,16ммоль) обробляють диметилсульфамоїлхлоридом, суміш перемішують 30 хвилин, потім кип'ятять із зворотним холодильником протягом 15 годин. Розчинник відганяють при пониженому тиску, додають воду і одержану суміш екстрагують трьома порціями хлороформу. Об'єднані, висушені (Na_2SO_4) екстракти упарюють при пониженому тиску до темно-коричневої смоли, яку очищають колонковою хроматографією на силікагелі (елювання: етилацетат), одержують цільову сполуку (46мг) у вигляді світло-оранжевої смоли, яка твердіє, т. пл. $82-85^\circ\text{C}$, m/e 422 (M^+).

Приклад 7

N-Ацетил-O-метоксикарбонілметилколхінол

Розчин N-ацетилколхінолу (500мг, 1,4ммоль) в сухому DMF (5мл) при 0°C обробляють метилбромацетатом (322мг, 2,1ммоль) і гідридом натрію (84мг, 60% суспензія в маслі, 2,1ммоль), суміш перемішують 30 хвилин. Додають воду (50мл) і суміш екстрагують чотирма порціями етилацетату. Об'єднані

екстракти промивають послідовно чотирма порціями води і двома порціями насиченого водного розчину хлориду натрію, сушать (MgSO₄), розчинник відганяють при пониженому тиску, одержують цільову сполуку (280мг) у вигляді твердої білої речовини, т. пл. 82-83°C, m/e 429,2 (M⁺). Елементний аналіз для C₂₃H₂₇NO₇·0,33H₂O: розраховано: С 63,45; Н 6,40; N 3,22; знайдено: С 63,53; Н 6,29; N 3,17.

Приклад 8

N-Ацетил-О-карбоксиметилколхінол

Розчин N-ацетил-О-метоксикарбонілметилколхінолу (140мг, 0,33ммоль) в ацетонітрилі (5мл) обробляють водним розчином гідроксиду калію (1,0М, 5мл), суміш нагрівають до 80°C і витримують при цій температурі протягом 30 хвилин. рН охолодженої суміші доводять до 3 за допомогою 2М соляної кислоти і екстрагують її чотирма порціями етилацетату. Об'єднані екстракти промивають двома порціями насиченого розчину хлориду натрію, сушать (MgSO₄) і упарюють при пониженому тиску. Додання ацетону (2мл) і гексану (1мл) веде до одержання цільової сполуки (58мг) у вигляді твердої білої речовини, т. пл. 220-221°C, m/e 415,3 (M⁺). Елементний аналіз для O₂₂H₂₅NO₇·0,33H₂O: розраховано: С 62,71; Н 6,14; N 3,32; знайдено: С 62,63; Н 6,02; N 3,26.

Приклад 9

N-Ацетил-О-циклопентоїлколхінол

Розчин N-ацетилколхінолу (200мг, 0,56ммоль) у сухому DMF (2мл) при 0°C обробляють гібридом натрію (33мг, 60% суспензія в маслі, 0,84ммоль), потім циклопентилбромідом (125мг, 0,84ммоль) і суміш перемішують 1 годину. Додають додаткову кількість гібриду натрію (17мг, 60% суспензія в маслі, 0,42ммоль) і циклопентилброміду (63мг, 0,42ммоль) і суміш перемішують протягом ночі при кімнатній температурі. Додають воду (10мл) і суміш екстрагують чотирма порціями етилацетату. Об'єднані екстракти промивають двома порціями насиченого водного розчину хлориду натрію, сушать (MgSO₄) і упарюють при пониженому тиску. Цільову сполуку (160мг) одержують у вигляді твердої білої речовини, т. пл. 8 9-94°C, m/e 425,3 (M⁺). Елементний аналіз для C₂₅H₃₁NO₅: розраховано: С 70,54; Н 7,35; N 3,29; знайдено: С 70,55; Н 7,35; N 3,25.

Приклад 10

N-Ацетил-10-нітроколхінол

Розчин N-ацетилколхінолу (100мг, 0,27ммоль) в льодяній оцтовій кислоті (20мл) повільно обробляють 20мл розчину концентрованої азотної кислоти (0,34мл) в оцтовій кислоті (100мл), зберігаючи температуру на рівні приблизно 12°C. Суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 18 годин, додають додатково 1мл розчину азотної кислоти в оцтовій кислоті і перемішування продовжують протягом 2 годин. Суміш виливають у лід та екстрагують трьома порціями етилацетату. Об'єднані екстракти промивають двома порціями насиченого водного розчину хлориду натрію, сушать (MgSO₄) та упарюють при пониженому тиску. Очищення на силікагелі (елюювання: етилацет) веде до одержання цільової сполуки (50мг) у вигляді твердої речовини світло-жовтого кольору, т. пл. 117-118°C, m/e 401,9 (M⁺). Елементний аналіз для C₂₀H₂₂N₂O₇·0,33H₂O: розраховано: С 58,82; Н 5,56; N 6,86; знайдено: С 58,87; Н 5,66; N 6,55.

Приклад 11

Для сполук прикладів 1-10 і N-ацетилколхінолу визначають активність відносно судинної мережі пухлини методом флуоресцентного барвника, описаним вище, введенням 50мг/кг.

Сполука прикладу №	% зниження об'єму судин
1	89
2	38
3	43
4	37
5	38
6	30
7	12
8	49
9	59
10	28
N-ацетилколхінол	78